

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

研究代表者 柴山 恵吾 （国立感染症研究所・細菌第二部・部長）

世界では新たな薬剤耐性菌が次々と出現し、拡散している。この研究は、国内の医療現場における新型耐性菌の出現を捕捉し、その耐性機構を分子生物学的手法により解明して、これら薬剤耐性菌の検出法、分子疫学解析法を開発するとともに、サーベイランスをより充実させて、国内での薬剤耐性菌の実態を把握するとともに医療現場での感染対策の策定のための基礎情報を得ることを目的とする。また、薬剤耐性メカニズムに立脚して新薬開発も試みる。国内では、2013年12月の時点までにNDM型カルバペネマーゼ産生菌等の新型耐性菌の分離例が数十例確認された。ほとんどの症例が外国で入院歴のある輸入例だった。海外、特に途上国への渡航者が現地の医療機関に入院し治療を受け、その後帰国して入院した場合は、これらの新型耐性菌の保菌の可能性について留意する必要があると考えられる。これらの他、国内分離株から複数の新型カルバペネム耐性遺伝子を見いだした。今後も、新たな耐性菌の分離について監視を継続する必要がある。これまで見出した新型耐性菌のいくつかについては、新たな検出法も確立した。また結核菌については、キャピラリー電気泳動による簡便な型別法を開発した。院内感染でしばしば問題となる *Acinetobacter* 属菌については、臨床分離株 998 株の薬剤感受性パターンの解析の結果、レボフロキサシンに耐性の場合には特にアウトブレイクを起こしやすい *A. baumannii* 流行タイプ ST2 の可能性が高いため注意が必要であることが分かった。肺炎球菌については、13 価肺炎球菌ワクチンの導入に伴い、ペニシリン耐性が多い血清型 19A 型が今後減少することが期待されることが分かった。MRSA については、懸念されるバンコマイシンの感受性の低下傾向は認められなかった。肺炎球菌ではテリスロマイシン耐性の増加が懸念されているが、耐性メカニズムが内因性 rRNA メチル化酵素の欠損であることを見出した。グラム陰性菌のホスホマイシン耐性については、耐性遺伝子 *fosA3* が *bla_{CTX-M}* 遺伝子と同時にプラスミド上に存在し、IS26 に挟まれる形で伝播していることが分かった。カルバペネマーゼのうち IMP-1 については、結晶構造から新規阻害剤クエン酸モノベンジルエステルの合成に成功した。今後、化合物を改良して新規抗菌薬の開発につながる事が期待される。厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業（JANIS）のデータを活用した研究では、検査部門のデータから感染症発症患者数の推定や、年次推移を調べる事が可能であることを示した。サーベイランスの精度向上に関する研究については、MRSA と *S. maltophilia* で調査したところ、精度管理の改善が必要な医療機関が相当あり、注意が必要であることが分かった。また集計にあたっては、VRE 等分離率の低い耐性菌ではアウトブレイクが起きている医療機関のデータを個別に手作業で除外する必要があることが分かった。サーベイランスデータを医療機関の感染対策に活用するツールとして、重要な耐性菌が異常に集積していることを自動で捕捉するソフトウェアを開発した。薬剤耐性菌に関しては、今後も基礎研究とサーベイランス研究が連携し、社会的に重要な耐性菌を把握し、そしてそれに対する対策の策定に資する研究を進める必要がある。また、医療現場での実際の感染対策に関する研究とも連携し、薬剤耐性菌に関する研究を包括的に進めて行く必要がある。

A. 研究目的

世界では新たな薬剤耐性菌が次々と出現し、拡散している。最近ではNDM型、KPC型やOXA-48型などのカルバペネマーゼ産生菌が途上国を中心に世界中に拡散している。日本国内でもこれらを含む様々な新型多剤耐性菌が確認されている。この研究は、国内の医療現場における新型耐性菌の出現を捕捉し、その耐性機構を分子生物学的手法により解明して、

これら薬剤耐性菌の検出法、分子疫学解析法を開発するとともに、サーベイランスをより充実させて、国内での薬剤耐性菌の実態を把握するとともに医療現場での感染対策の策定のための基礎情報を得ることを目的とする。また、薬剤耐性メカニズムに立脚して新薬開発も試みる。

B. 研究方法

国内の医療機関で分離されたカルバペネム耐性菌や、多剤耐性菌を収集し、新型耐性菌の発生を監視し、またそれらがどのような耐性メカニズムをもつのかを分子生物学的手法により解析した。そして、それらについて簡便、迅速な検出法、分子疫学解析法を開発した。また、耐性に関与する酵素の構造機能解析を行い、新薬の開発も試みた。サーベイランスに関しては、JANIS 検査部門データを利用した感染症発生数の推定や、サーベイランスの精度向上に関する研究、またサーベイランスデータを臨床現場の感染対策に活用するツール開発を行った。

倫理面への配慮

菌株の収集にあたり、患者の海外渡航歴など、患者情報も収集した場合は予め国立感染症研究所倫理委員会の承認を得た。

JANIS データを用いた研究は、統計法による利用申請を行い、承認を得て実施した。

C. 研究結果

国内では、2013年12月の時点までにNDM型カルバペネマーゼ産生菌が11例、KPC型カルバペネマーゼ産生菌が7例、OXA-48型カルバペネマーゼ産生菌が2例把握された。ほとんどの症例が外国で入院歴のある輸入例だった。また、NDM-1、OXA-48を同時に産生し、かつテトラサイクリン、ホスホマイシン、ST合剤にも耐性を示す多剤耐性株も見出された。海外、特に途上国への渡航者が現地の医療機関に入院し治療を受け、その後帰国して入院した場合は、これらの新型耐性菌の保菌の可能性について留意する必要があると考えられる。これらの他、国内分離株から新型カルバペネマーゼ遺伝子PAM-1、TMB-2、IMP-43、IMP-44を見いだした。ネパールの医療機関で分離された株からは新規NDMバリエーションNDM-8を見出した。今後も、新たな耐性菌の分離について監視を継続する必要がある。NDM型カルバペネマーゼ産生菌はメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)産生菌のスクリーニング法であるSMAディスク法により検出可能であることが分かった。また、MBLと同時に他のβ-lactamaseを産生する株についても、SMAディスク法で検出可能であることも示された。緑膿菌に関しては、これまでに開発したIMP-type MBL、AAC(6')-IaeおよびAAC(6')-Ib産生多剤耐性緑膿菌臨床分離株迅速診断キットを組み合わせれば、日本で分離される多剤耐性緑膿菌の約8割を迅速に検出できることが分かった。GBSについては、ペニシリン低感受性株が近年分離されているが、まずGBS自体を簡便に検出するため、LAMP法を開発した。*Acinetobacter* 属菌については、临床上重要な *A. baumannii*、*A. pittii*、*A. nosocomialis* を鑑別するMultiplex PCR法を開発した。また企業との共同研究で、*A. baumannii* の中でも特にアウトブレイクを起こしやすい遺伝子型ST2を簡便に検出するQprobe-PCR法を開発した。薬剤耐性菌の分子疫学に

ついては国立病院機構の86病院に協力頂き、*Acinetobacter* 属菌998株を収集した。その中で78%が *A. baumannii* で、そのうち28%はアウトブレイクを起こしやすい流行タイプST2だった。なお、多剤耐性 *A. baumannii* は全てアミノグリコシド耐性遺伝子 *armA* を保有していることが分かった。結核菌については、一般的に用いられている遺伝子型別法VNTR法を改良し、キャピラリー電気泳動装置を使用しより簡便かつ正確に型別を行う方法を開発した。肺炎球菌では、収集したペニシリン耐性株16株中、9株が血清型19Aだった。この血清型は、昨年度導入された13価肺炎球菌ワクチンでカバーされているため、今後分離率が減少することが予想される。MRSAについては、臨床分離株のバンコマイシンの感受性の低下が懸念されているが、収集株を実験室で測定したところそのような傾向は認められなかった。MBLを産生する腸内細菌科細菌は、必ずしもカルバペネムに耐性を示さないが、臨床から分離されたMBL陽性 *Enterobacter cloacae* の71株を調べたところ22.5%のみが耐性だった。薬剤感受性検査成績のみでMBLs産生菌株を検出することは困難であることが再確認された。*Helicobacter fennelliae* については全ゲノム配列を決定し、データベースに登録した。肺炎球菌ではテリスロマイシン耐性の増加が懸念されているが、耐性メカニズムが内因性rRNAメチル化酵素の欠損であることを見出した。近年、大腸菌においてキノロン耐性が増加しているが、プラスミド性のキノロン耐性遺伝子 *qnrA* の存在がシプロフロキサシン暴露時の菌の生存に有利に働いていることが分かった。ホスホマイシン耐性遺伝子 *fosA3* については、*bla_{CTX-M}* 遺伝子と同時にプラスミド上に存在し、IS26に挟まれる形で伝播していることが分かった。菌の生存カルバペネマーゼのうちIMP-1については、結晶構造から新規阻害剤クエン酸モノベンジルエステルを合成した。今後、化合物を改良して新規抗菌薬の開発につながる事が期待される。厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(JANIS)のデータを活用した研究では、リステリアを例にとり、検査部門のデータから感染症発症患者数の推定や、年次推移を調べる事が可能であることが示された。サーベイランスの精度向上に関する研究については、MRSAでは本来はβ-ラクタム系薬はMICに関わらず耐性と報告されるべきところが、2012年の報告ではCEZ 1.7%、CMZ 4.6%、IPM/CS 1.7%がSまたはIと報告されており、また *S. maltophilia* ではIPM/CSは自然耐性でありRと報告されるべきであるが、223施設はSが0%であったものの、28施設においては1~100%となっていた。精度管理の改善が必要な医療機関が相当あることが分かった。集計にあたっては、VRE等分離率の低い耐性菌ではアウトブレイクが起きている医療機関のデータを除くことで全体集計が適切に出来る事が示された。また、サーベイランスデータを医療機関の感染対策に活用するツールとして、重要な耐性菌が異常に集積して

いることを自動で捕捉する簡易アルゴリズムと2DCM-webのepi-curve機能の改良を行った。感染対策に関する研究では、「NICUのMRSA保菌と感染症についての見解と提言2014」を作成中である。

D. 考察

NDM型等、外国で蔓延している新型耐性菌の国内での分離は、海外、特に途上国への渡航者が現地の医療機関に入院し治療を受け、その後帰国して入院した例がほとんどだった。NDM型、KPC型、OXA-48型カルバペネマーゼ産生菌は、国内では今のところ院内感染による拡散は把握されていない。一方で、国内でも全く新型の耐性遺伝子を持つ耐性菌の分離が確認された。研究班では、今後もこれまでに国内で確認されているものに加え、海外からの輸入例、そして国内での新型耐性菌の発生を幅広く継続的にモニタリングしていく予定である。そしてそれらの検出法の開発、分子疫学解析、また耐性の分子メカニズムの解析など、感染対策に必要な基礎応用研究を進める予定である。

サーベイランスデータを医療現場の感染対策に効果的に活用するためには、サーベイランスの精度を高めるとともに、解析データを出来るだけ分かりやすい形で現場に還元することが必要である。この研究班では、データ集計の精度向上に関する研究と、医療現場へ提供する還元情報を改良するための研究を引き続き行う。実際に医療現場でサーベイランスデータを活用する方法については、他の担当研究班で検討されることであるが、その班と引き続き密に連携して、薬剤耐性菌に対する対策を基礎研究、サーベイランス、および医療現場での感染対策という軸で有機的に連携させ、研究を進めて行く予定である。

E. 結論

海外で蔓延しているNDM型、KPC型、OXA-48型カルバペネマーゼ産生菌などの新型耐性菌が国内に断続的に流入していることが確認された。また国内でも全く新型の耐性菌が発生していることが確認された。これらの耐性菌の中で、多剤耐性緑膿菌、*Acinetobacter*属菌、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌については検出法や分子疫学解析法を考案した。IMP型カルバペネマーゼは蛋白の結晶化及び構造解析を行い、阻害剤の開発に成功した。サーベイランスの研究では、精度向上に関して、医療現場の検査上および感染研におけるデータ集計上の課題が明らかになった。また、サーベイランス結果を臨床現場の感染対策により効果的に生かすため、重要な耐性菌の異常集積を捕捉するシステムを構築した。

F. 健康危険情報

海外、特に途上国への渡航者が現地の医療機関に入院し治療を受け、その後帰国して入院した場合は、NDM型等の新型耐性菌を保菌していることがあるた

め、注意が必要である。また、輸入例だけでなく国内でも新型の耐性菌の分離が見られるので注意が必要である。

*Acinetobacter*属菌については、分離菌がフルオロキノロンに耐性を示す場合は、特にアウトブレイクを起こしやすい*A. baumannii*流行タイプST2の可能性が高いため、拡散防止対策等感染対策に特に注意を払う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表
(各々の分担報告書に記載のため省略)
2. 学会発表
(各々の分担報告書に記載のため省略)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- (予定も含む。)
1. 特許取得
(各々の分担報告書に記載のため省略)
 2. 実用新案登録
(各々の分担報告書に記載のため省略)
 3. その他
(各々の分担報告書に記載のため省略)

